

Морфологічний стан кори головного мозку щурів після холодових впливів

UDC 612.592:612.82.014.2

V.V. Lomako^{1*}, O.V. Shylo¹, L.M. Pirozhenko²

Brain Cortex Morphology in Rats After Cold Exposures

Реферат: Вивчали морфологічні зміни у сенсомоторній корі головного мозку 6-місячних щурів після короточасних переривчастих та тривалих безперервних холодових впливів (КПХВ і ТБХВ відповідно). За цих умов у тканині мозку на тлі збереженої цито- і мієлоархітектоніки відзначаються периваскулярний і перицелюлярний набряк, дрібні поодинокі осередки некрозу з явищами гліозу, «пористий» нейропіль (за умов КПХВ при -12°C — ознаки, при ТБХВ — формування), дистрофічно змінені нейрони, нейрони з ядрами на різних стадіях некробіозу. Частина мікросудин мала ознаки запалення та тромби. Після КПХВ за -12°C спостерігається помірна констрикція, а за 10°C — дилатація мікросудин. Результати фрактального аналізу показали зменшення фрактальної розмірності зрізів кори мозку за умов КПХВ при -12°C та ТБХВ.

Ключові слова: охолодження, морфологія кори головного мозку, фрактальна розмірність, короточасні переривчасті холодові впливи, тривалий безперервний холодовий вплив.

Abstract: Morphological changes of the brain cortex sensorimotor area in 6-month-old rats were studied after short-term intermittent and long-term continuous cold exposures (STICE and LTCCE, respectively). Under these conditions, perivascular and pericellular edema, small solitary foci of necrosis with gliosis phenomena, 'porous' neuropil (signs under STICE at -12°C and formation during LTCCE), dystrophically changed neurons, neurons with nuclei at different stages of necrobiosis were noted in the brain tissue against the background of native cyto- and myeloarchitectonics. Some of the microvessels had signs of inflammation and thrombi. A moderate constriction (after STICE at -12°C) and a dilatation (after STICE at 10°C) of microvessels were observed. According to the fractal analysis, a decrease in the fractal dimension of the brain cortex sections was found under both STICE at -12°C and LTCCE.

Key words: cold, brain cortex morphology, fractal dimension, short-term intermittent cold exposures, long-term continuous cold exposure.

Природна і штучна холодова адаптація (ХА) відбувається шляхом аклімації або акліматизації та включає генетичні, фізіологічні, морфологічні або поведінкові реакції, які можуть посилюватися або пригнічуватися. Характер ХА залежить від типу (повітря або вода) та інтенсивності (безперервна або періодична) холодового впливу. Функціональне значення фізіологічної ХА наразі не з'ясовано, і деякі відповідні реакції можуть бути не тільки шкідливими та спричинити холодові травми, але й підвищувати здатність організму до виживання в умовах низької температури навколишнього середовища [13, 15].

Холодові навантаження на організм моделюються утриманням дрібних лабораторних тварин у клітках в умовах короточасного переривчастого або тривалого безперервного холодового впливу (КПХВ та ТБХВ відповідно), що обумовлює характер ХА. За ТБХВ відбуваються

Natural and artificial cold adaptation (CA) occurs either through acclimation or acclimatisation and involves genetic, physiological, morphological or behavioural responses that can be enhanced or suppressed. The CA nature depends on the type (air or water) and intensity (continuous or intermittent) of cold exposure. Functional significance of physiological CA has not been determined yet, and some responses may not only be harmful and cause cold injuries, but also increase the body's ability to survive at low ambient temperatures [10, 13].

Cold loads onto the body are simulated by keeping small laboratory animals in cages under short-term intermittent or long-term continuous cold exposures (STICE and LTCCE, respectively), that determines the CA nature. In case of LTCCE, the whole-body cooling, a pronounced vasoconstriction and metabolism acceleration occur, while the STICE without significant body cooling can promote the

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

² КНП «Люботинська міська лікарня» ЛМХО, м. Люботин, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: victoria0regia@gmail.com

Надійшла 30.12.2022

Прийнята до друку 18.09.2023

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² MNO 'Liubotyn Town Hospital' of Liubotyn Town Council of Kharkiv Region, Liubotyn, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: victoria0regia@gmail.com

Received 30, December, 2022

Accepted 18, September, 2023

загальне охолодження тіла, виражене звуження кровоносних судин і пришвидшення метаболізму, тоді як КПХВ без помітного охолодження тіла може сприяти габітуації — особливій формі ХА, коли відповідні реакції організму на сприйняття холоду зменшуються [15]. Вплив холоду викликає специфічні та скоординовані терморегуляторні реакції організму, при цьому активуються численні ділянки головного мозку, зокрема у неокортексі, гіпоталамусі та стовбурі [23]. Кортикальні структури мозку, які опосередковують реакції на холод, чітко не ідентифіковані, однак сенсомоторна, премоторна, префронтальна, передня поясна ділянки та острівцеві залучаються до реалізації відчуття холоду у людини [22].

Оскільки морфологічний стан кортикальних структур, які залучені до обробки температурної інформації і сприяють розвитку габітуації, дотепер не вивчено, було проведено гістологічне дослідження кори головного мозку щурів після різних режимів холододових впливів.

Матеріали і методи

Дизайн досліджень схвалено комітетом із біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Експерименти проводили відповідно положень Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) і «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Робота виконана на 6-місячних самцях білих безпородних аутбредних щурів.

За умов КПХВ щурів утримували за -12 або 10°C у холододовій камері протягом 15 хв кожної години, потім 45 хв вони знаходилися поза холододовою камерою за $22-24^{\circ}\text{C}$. Таким чином КПХВ проводили дев'ять раз протягом світлої частини доби. Для моделювання ТБХВ тварин утримували у холодному приміщенні в окремих клітках за температури $(5,5 \pm 1,5)^{\circ}\text{C}$ протягом місяця. Щури були розділені на групи ($n = 5$ у кожній): інтактні (контроль); КПХВ при 10°C ; КПХВ при -12°C та ТБХВ. Тварин з експерименту виводили шляхом декапітації.

Гістологічне дослідження кори головного мозку виконували за стандартною методикою: вилучені фрагменти тканини мозку фіксували у 10%-му розчині нейтрального формаліну протягом 24 годин. Після відмивання фіксований матеріал зневоднювали у спиртах зростаючої концентрації і заливали у парафін. Отримані зрізи завтовшки 6–8 мкм забарвлювали гематок-

habituatio, a special form of CA, when the body's responses to cold perception are reduced [13]. The exposure to cold induces specific and coordinated thermoregulatory responses of the body, at the same time multiple brain regions are activated, including those in the neocortex, hypothalamus, and brainstem [23]. The cortical brain structures that mediate responses to cold have not been clearly identified, but the sensorimotor, premotor, prefrontal, anterior cingulate regions and the insula are involved in the realisation of cold sensation in human [21].

Since the morphological state of cortical structures, involved in processing of temperature information and contributing to habituation development is yet unexplored, the rat brain cortex after different modes of cold exposure was histologically examined.

Materials and methods

The research design was approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine. The experiments were performed in accordance with the provisions of the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals against Cruelty' (No. 3447-IV of February 21, 2006) and European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). The research was performed in 6-month-old white outbred male rats.

Under STICE, the rats were kept at -12 or 10°C in a cold chamber within 15 min of each hour, the next 45 min they were outside the cold chamber at $22-24^{\circ}\text{C}$. In this way, STICE was performed nine times during daylight. To simulate LTCCE, the animals were kept in a cold room in separate cages at a temperature of $(5.5 \pm 1.5)^{\circ}\text{C}$ for a month. Rats were divided into the following groups ($n = 5$ in each): intact (control); STICE 10°C ; STICE -12°C , and LTCCE. Animals were sacrificed by decapitation.

The brain cortex histology was performed according to the standard technique: the removed brain tissue fragments were fixed in a 10% solution of neutral formalin for 24 hrs. After washing out, the fixed material was dehydrated in alcohols of increasing concentration and embedded into paraffin. The resulting 6-8 μm thick slices were haematoxylin and eosin stained. The preparations were examined, photographed and digitised using an AmScope IN300T-FL light microscope (AmScope, USA) and a Tucsen TCC-5OICE camera (Tucsen, UK). Parameters of video camera aperture, illumination and microscope magnification were constant ($\times 160$). For visual and fractal analysis,



силіном і еозином. Препарати вивчали, фотографували і оцифровували за допомогою світлового мікроскопа «AmScope IN300T-FL» (AmScope, США) і фотокамери «Tucsen TCC-50ICE» (Tucsen, Велика Британія). Параметри діафрагми відеокамери, освітлення та збільшення мікроскопа були постійними ($\times 160$). Для візуального і фрактального аналізу було записано 100 зображень. Фрактальну розмірність (FD) зрізів мозку розраховували за допомогою пакета «Fractal Box Counting для ImageJ 1.53t» (National Institutes of Health, США) [21].

Статистичну обробку результатів проводили методом однофакторного дисперсійного аналізу «ANOVA», відмінності вважали значущими при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Міелоархітектоніка кори мозку щурів контрольної групи виявлялася у вигляді смуг молекулярного, зовнішнього та внутрішнього зернистих та гангліонарного шарів (рисунок, А). Було видно поодинокі фібробласти і макрофаги та багато кровоносних судин. Переважало рівномірне забарвлення нейропіля еозином (рисунок, А), яке свідчить про однаковий вміст води у біолоїдах цитоплазми складових нейропіля (аксонів, дендритів, синапсів, відростків астроцитів) [1, 10]. Після КПХВ -12°C у корі мозку щурів відзначалися ознаки формування пористого нейропіля (рисунок, В), тобто помірне набухання мікроглії та помірний периваскулярний набряк [1, 10]. На тлі збереженої цито- і міелоархітектоніки спостерігалися нейрони з помірним перичелюлярним набряком, темною цитоплазмою та дистрофічними змінами, з ядрами на різних стадіях некробіозу, а також велика кількість гліальних клітин (рисунок, В). Крім того, спостерігалися поодинокі дрібні осередки некрозу з явищами гліозу і сателітозу.

Порівняльний аналіз двох режимів КПХВ -12 та 10°C виявив подібні патоморфологічні зміни, а саме: локальний помірний периваскулярний та перичелюлярний набряк, дистрофічно змінені нейрони; нейрони з ядрами на різних стадіях некробіозу (рисунок, В) та збільшення кількості світлих нейронів (рисунок, С); дрібні поодинокі осередки некрозу з явищами гліозу тощо. За КПХВ 10°C спостерігали помірне розширення та повнокров'я мікросудин, тоді як за КПХВ -12°C вони були помірно або подекуди різко звужені та зі слабким кровонаповненням. По периферії осередків некрозу або поза ними у частини судин спостерігалися ознаки запалення, подекуди тромбоз (рисунок, В та С).

100 images were recorded. The fractal dimension (FD) of brain slices was calculated using the 'Fractal Box Counting package for ImageJ 1.53t' (National Institutes of Health, USA) [20].

The results were statistically processed using the one-factor 'ANOVA' analysis of variance, differences were considered significant at $p < 0.05$.

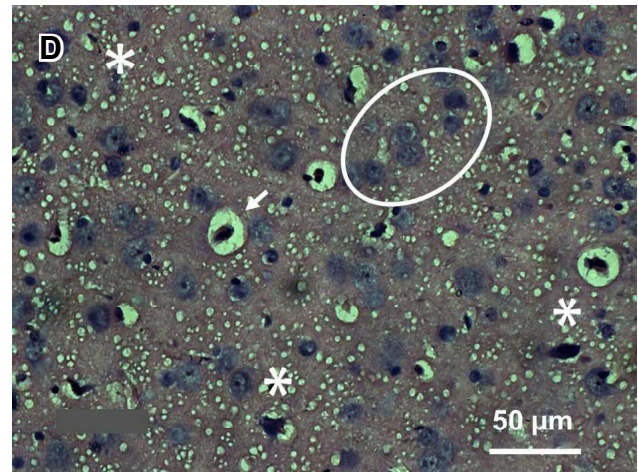
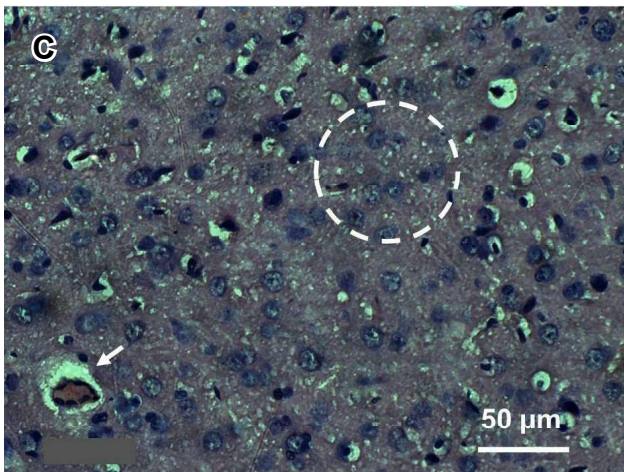
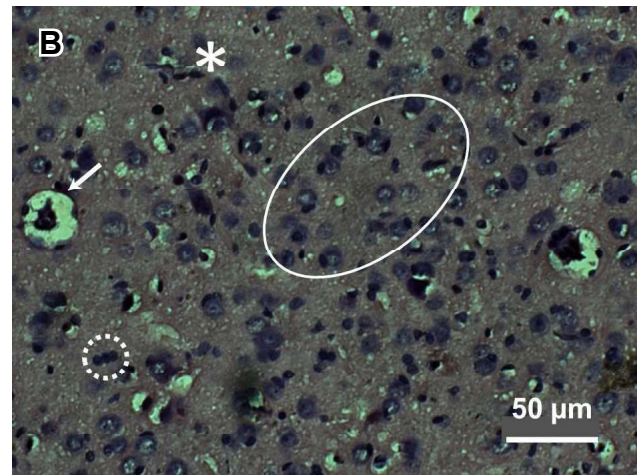
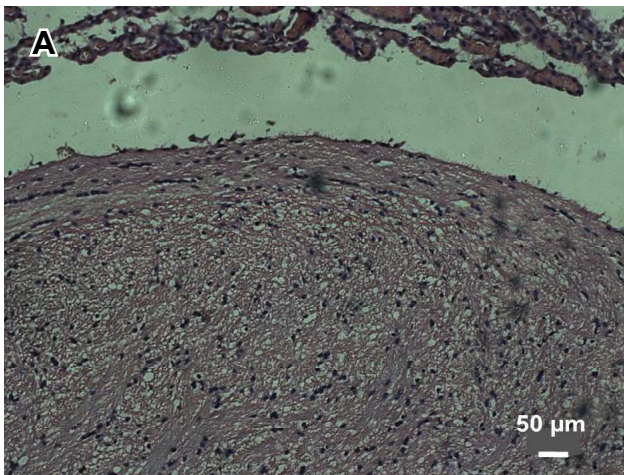
Results and discussion

Myeloarchitectonics of the brain cortex in the control group rats was manifested in the form of bands of molecular, outer and inner granular and ganglionic layers (Figure, A). Single fibroblasts and macrophages and many blood vessels were visible. A uniform staining of neuropil with eosin prevailed (Figure, A), thus evidenced an equal water content in cytoplasmic biocolloids of neuropil components (axons, dendrites, synapses, astrocyte processes) [1, 5]. After STICE -12°C , the signs of 'porous' neuropil formation (Figure, B), *i. e.* a moderate swelling of microglia and moderate perivascular edema were observed in rat brain cortex [1, 5]. Against the background of preserved cyto- and myeloarchitectonics, the neurons with moderate pericellular edema, dark cytoplasm and dystrophic changes, with nuclei at different stages of necrosis, as well as a large number of glial cells were seen (Figure, B). In addition, single small foci of necrosis with the phenomena of gliosis and satellitosis were noted.

Comparative analysis of two regimens of STICE -12 and 10°C revealed similar pathomorphological changes, namely the local moderate perivascular and pericellular edema, dystrophically altered neurons, those with nuclei at different stages of necrobiosis (Figure, B), an increased number of light neurons (Figure, C); small single foci of necrosis with gliosis, etc. Under STICE 10°C , the moderately dilated and full-blooded microvessels were observed, whereas under STICE -12°C , they were moderately or somewhere sharply narrowed, with insufficient blood filling. Some vessels had the signs of inflammation, somewhere thrombosis on the periphery of necrotic foci or outside them (Figure, B and C).

After LTCCE, a significant swelling of microglia and severe perivascular edema of vessels occurred, that characterised the 'porous' neuropil formation (Figure D) and, particularly, indicated ischemia [4]. Dystrophically altered neurons, those with nuclei at different stages of necrobiosis, neurons with light cytoplasm and pericellular edema, and single glial cells were also noted. The number of neurons in the field of view was lower than at STICE. There were single small foci of necrosis with gliosis,





Кора головного мозку щура після різних режимів холодового впливу: **A** — контроль; **B** — КПХВ -12°C ; **C** — КПХВ 10°C ; **D** — ТБХВ. Ознаки (**B**) і формування (**D**) пористого нейропіля (зірочка), гліальні клітини (точкове коло), нейрони із темною цитоплазмою та ядрами на різних стадіях некробіозу (білий овал), нейрони із світлою цитоплазмою (штриховане коло), периваскулярний набряк, тромб, звуження (**B**) та розширення (**C**) мікросудини (стрілка). Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Brain cortex of rat after different modes of cold exposure: **A** – control; **B** – STICE -12°C ; **C** – STICE 10°C ; **D** – LTCCE. Signs (**B**) and formation (**D**) of 'porous' neuropil (asterisk), glial cells (dotted circle), neurons with dark cytoplasm and nuclei at different stages of necrobiosis (white oval), neurons with light cytoplasm (dashed circle), perivascular edema, thrombus, microvessel narrowing (**B**) and dilation (**C**) (arrow). H&E staining.

Після ТБХВ відбувалися істотне набухання мікроглії та виражений периваскулярний набряк судин, що характеризує формування пористого нейропіля (рисунок, D) та, зокрема, є ознакою ішемії [9]. Також відзначали дистрофічно змінені нейрони, нейрони з ядрами на різних стадіях некробіозу, нейрони із світлою цитоплазмою і перичелюлярним набряком, поодинокі гліальні клітини. Кількість нейронів у полі зору була менше ніж за КПХВ. Спостерігалися поодинокі дрібні осередки некрозу з явищами гліозу, помірно розширені та помірно повнокровні мікросудини, частина з яких мала ознаки запалення та тромбозу.

Для оцінки структурної складності зображення розраховують FD, яка вважається більш чутливим показником і кількісно характеризує морфологічні зміни, які аналізуються виключно

moderately dilated and moderately full-blooded microvessels, some of which showed the signs of inflammation and thrombosis.

To assess the structural complexity of an image, the FD is calculated. It is considered to be a more sensitive index, and it quantitatively characterizes the morphological changes that are analysed only subjectively. Fractal analysis enables to characterise biological structures with a complex tree-like branching shape and fractal properties: self-similarity and self-repeatability, *i. e.* the objects composed of the n number of parts, each of them being similar to the whole structure [14]. In more detail, the FD is a degree of space filling by structure and the extent of the organization's complexity (including the one of branching): an object with FD value = 1 virtually does not fill the space, but with FD = 2 it fills almost all available space [15]. The calculation showed



суб'єктивно. Фрактальний аналіз дозволяє охарактеризувати біологічні структури зі складною деревоподібно розгалуженою формою і властивостями фракталів — самоподібність та самоповторюваність, тобто об'єкти, складені з n -ої кількості частин, кожна з яких подібна до всієї фігури загалом [16]. Детальніше, FD є показником ступеня заповнення структурою простору та мірою складності організації (у тому числі й мірою розгалуженості): об'єкт із значенням $FD = 1$ практично не заповнює простір, а із $FD = 2$ заповнює практично весь доступний простір [4]. Розрахунок показав доцільність і чутливість FD для опису морфологічних змін і складності структур головного мозку [4], специфічних кортикальних характеристик, пов'язаних із впливом охолодження на організм [3], віковими або патологічними процесами [18].

Отже, FD зрізів кори мозку щурів після КПХВ -12°C та ТБХВ значуще зменшувалася (таблиця), тобто у цих умовах за збереженої загальної архітектоники мозкової тканини відбувалася перебудова нейро-гліально-ендотеліальних взаємодій у бік зменшення структурної складності, що і виявляється за допомогою аналізу FD. Слід зазначити, що нейронні механізми, які лежать в основі зниження кортикальної складності, ще не визначені [18]. Високі показники FD характеризують активну когнітивну діяльність, а її зниження відбувається з віком або на тлі нейродегенеративних захворювань [17, 18].

Відомо, що функціональна активність, відновлення і загибель нейронів ЦНС підтримуються взаємодіями з астро- та олігодендроцитами, які забезпечують певний баланс іонів, ростових і трофогенних факторів у міжклітинному просторі, а також визначають рівень метаболізму нейро-медіаторів, що вивільнюються в процесі синаптичної передачі [7]. Нейрони володіють молекулярними механізмами відповіді на вплив екзо- та ендогенних факторів (у тому числі й пошкоджуючих), у реалізації яких важливу роль відіграють спеціалізовані гліальні клітини, що мігрують до ушкоджених нейронів. При цьому спостерігається феномен перинеуронального гліально-клітинного сателітозу і гліозу [5, 6, 10, 20]. Перичелюлярний і периваскулярний набряк супроводжується вакуолізацією дендритів і нейропілія [1, 19]. Частина рідини, яку вже не утримують біолоїди цитоплазми, трансформується у вільний стан і переходить у міжклітинний простір. Внаслідок чого знижується вміст інтрацелюлярної води, що супроводжується зменшенням структурних проявів набряку-набухання нейропілія. При цьому переважають явища

the expediency and sensitivity of FD for describing morphological changes and complexity of brain structures [15], specific cortical features associated with cooling impact on the body [12], and age-related or pathological processes [17].

Thus, the FD of cortical slices of rats after STICE -12°C and LTCCE significantly reduced (Table), *i. e.* under these conditions with preserved general architectonics of the brain tissue, the neuro-gliendothelial interactions were rearranged towards a decrease in structural complexity, as revealed by FD analysis. Notably, that the neural mechanisms underlying the reduced cortical complexity have not been determined yet [17]. High FD scores characterise the active cognitive activity, and its decline occurs either with age or against the neurodegenerative diseases [16, 17].

It is known that functional activity, recovery and death of CNS neurons are supported by interac-

Фрактальна розмірність зрізів кори головного мозку щурів після холодкових впливів, $M \pm S$
Fractal dimension of cortical slices of rats after cold exposure, $M \pm S$

Групи щурів Groups of rats	Значення FD FD values	F критичне; P F critical; P
Контроль Control	$1,854 \pm 0,001$	-
КПХВ 10°C STICE 10°C	$1,873 \pm 0,001$	18,513; 0,74
КПХВ -12°C STICE 12°C	$1,735 \pm 0,001^*$	18,513; 0,03
ТБХВ LTCCE	$1,788 \pm 0,001^*$	18,513; 0,03

Примітка: * — відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0,05$.

tions with astro- and oligodendrocytes, ensuring a certain balance of ions, growth and trophogenic factors in intercellular space, and determine the metabolism level of neurotransmitters released during synaptic transmission [2]. Neurons possess molecular mechanisms of response to the impact of exogenous and endogenous factors (including damaging ones), in the implementation of which an important role belongs to the specialised glial cells that migrate to the damaged neurons. At the same time, the phenomenon of perineuronal glial-cell satelliteosis and gliosis is observed [1, 5, 19, 22]. Pericellular and perivascular edema is accompanied by vacuolisation of dendrites and neuropil [9, 18].



набухання і вакуолізації дендритів, набухання астроцитів нейропіля. Набряк і набухання розглядаються як взаємозв'язані прояви дисфункції водно-електролітного обміну, які призводять або до незворотної гідропічної дистрофії, або до відновлення водно-іонного балансу і гідратації клітинних білків [1, 6, 19]. Такі зворотні зміни супроводжуються деструкцією частини нейронів. Крім того, інколи виявляється набряк гліальних клітин і перичелюлярний набряк окремих нейронів. Помірний перичелюлярний набряк є паранекротичним (оборотним) процесом. Ключову роль у розвитку набряку-набухання відіграє аквапорин 4 — трансмембранний білок водних каналів клітинних мембран, який регулює транспорт води між кровоносними судинами і астроцитами та є основним водним каналом у клітинах ЦНС [12, 24].

Висока швидкість окиснювальної метаболічної активності як перший адаптивний механізм проти холодого впливу призводить до збільшення продукції активних форм кисню на тлі низької концентрації ендogenous антиоксидантів, наслідком чого є окиснювальний стрес. Активуються перекисні процеси, пошкоджуються мембрани і цілісність тканин, що сприяє винятковій вразливості мозку [8], порушується енергетичний метаболізм мітохондрій, що викликає загибель нейронів шляхом некрозу або апоптозу [14]. При цьому реакція нейронів на цей поширений стрес у мозку неоднакова: якщо більшість нейронів можуть впоратися зі збільшенням оксидативного стресу, то окремі популяції нервових клітин є вразливими і зазвичай першими втрачають функціональну активність і гинуть [24].

Вазогенний периваскулярний набряк, дегенерація/некроз нейронів і перичелюлярний набряк у головному мозку можуть виникати у разі неможливості адаптуватися до холодого впливу та за подальшого розвитку гіпотермії [9], а внаслідок ішемії ушкоджуються астроцити, дисфункція яких може призвести до загибелі або порушення функціональної активності нейронів [11].

У нейроні за умов вичерпання або спотворення всіх захисних механізмів активуються складні молекулярні системи, які реалізують його загибель активацією процесів апоптозу або некрозу [5]. Останні протікають у клітинах безперервно, що забезпечує гомеостаз і нормальну життєдіяльність організму та сприяє стимулюванню фізіологічної регенерації. Структурні ж пошкодження/зміни у тканинах мозку відносяться до «еволюційно консервативних» і активують оптимальні адаптивно-приспосувальні реакції [2].

A part of fluid, which is no longer retained by cytoplasmic biocolloids, is transformed into a free state and passes into an intercellular space. As a result, the content of intracellular water decreases, accompanied by diminution of structural manifestations of edema-swelling of neuropil. Herewith, the phenomena of swelling and dendrite vacuolisation, swelling of neuropil astrocytes prevail. Edema and swelling are considered as interrelated manifestations of water-electrolyte metabolism dysfunction, resulting in either irreversible hydropic degeneration or restoration of water-ion balance and hydration of cellular proteins [1, 9, 18]. Such reversible changes are accompanied by destruction of some neurons. In addition, glial cell edema and pericellular edema of individual neurons are sometimes detected. Moderate pericellular edema is a paranecrotic (reversible) process. A key role in the edema-swelling development belongs to aquaporin 4 — a transmembrane protein of cell membrane water channels that regulates water transport between blood vessels and astrocytes and is the main water channel in CNS cells [7, 24].

A high rate of oxidative metabolic activity as the first adaptive mechanism against cold exposure leads to an increase in production of reactive oxygen species against a background of low concentration of endogenous antioxidants that results in oxidative stress. Peroxidation processes are activated, the membranes and integrity of tissues are damaged, thus promoting an exceptional vulnerability of the brain [3], and a disorder in mitochondrial energy metabolism that entails neuronal death via necrosis or apoptosis [11]. At the same time, the response of neurons to this widespread stress in the brain is not uniform: while most neurons can cope with an increase in oxidative stress, certain populations of nerve cells are vulnerable and are usually the first to lose functional activity and die [24].

Vasogenic perivascular edema, neuronal degeneration/necrosis and pericellular edema in the brain may occur in case of inability to adapt to the cold exposure and further development of hypothermia [4], but as a result of ischaemia the astrocytes are damaged, whose dysfunction can lead to death or impaired functional activity of neurons [6].

In a neuron, when all defence mechanisms are either exhausted or distorted, the complex molecular systems, implementing its death by triggering apoptosis or necrosis, are activated [22]. The latter occur in cells continuously by ensuring homeostasis and normal vital activity of the body and promoting stimulation of physiological regeneration. Whereas the structural damages/changes in brain tissue are referred to the 'evo-



На нашу думку, виявлені морфологічні зміни можуть також свідчити про незавершеність за умов КПХВ і перенапруженість при ТБХВ процесів адаптації, тому проблема потребує подальших досліджень.

Висновки

Отже, у корі головного мозку щурів після коротко- та довготривалих ХВ відбуваються подібні, але різні за вираженістю зміни, більшість яких мають оборотний компенсаторно-адаптивний характер. На тлі збереженої цито- і мієлоархітектоніки відзначаються периваскулярний і перичелюлярний набряк, дрібні поодинокі осередки некрозу з явищами гліозу, пористий нейропіль (за умов КПХВ -12°C — ознаки, після ТБХВ — формування), дистрофічно змінені нейрони, нейрони з ядрами на різних стадіях некробіозу. Частина мікросудин має ознаки запалення. Після КПХВ за 10°C спостерігається помірне розширення, а за -12°C — звуження мікросудин. Значуще зменшення фрактальної розмірності зрізів кори мозку виявляється за умов КПХВ -12°C та ТБХВ.

lutionarily conservative' and activate the optimal adaptive reactions [8].

We believe that the revealed morphological changes may also indicate the incompleteness of adaptation processes under STICE and their overstrain at LTCCE, therefore this issue is to be further explored.

Conclusions

Thus, in the rat brain cortex after short- and long-term CA, the similar but different in severity changes occur, most of which have a reversible compensatory-adaptive nature. Against the background of preserved cyto- and myeloarchitectonics, the perivascular and pericellular edema, small single necrotic foci with gliosis, 'porous' neuropil (the signs under STICE -12°C , and formation after LTCCE), dystrophically altered neurons, neurons with nuclei at different stages of necrosis were observed. Some microvessels showed the signs of inflammation. After STICE at 10°C , a moderate dilation was noted, and at -12°C the microvessels were narrowed. A significant decrease in the fractal dimension of cortical slices was found under STICE -12°C and LTCCE.

Література

1. Квитницький-Рыжов ЮН. Отек и набухание головного мозга. Киев: Здоров'я; 1978: 184 с.
2. Крыжановский ГН. Общая патофизиология нервной системы: Руководство. Москва: Медицина; 1997: 351 с.
3. Луценко ДГ, Марченко ВС, Бабійчук ВГ. NO-залежні механізми дії ритмічних холодових впливів на функціональну архітектоніку мікрогемодинамічного русла головного мозку щурів. Проблеми криобіології. 2011; 21(2): 117–24.
4. Мар'єнко НІ, Степаненко ОЮ. Фрактальний аналіз мозочка людини за даними магнітно-резонансної томографії: метод дилатації пікселів. Морфологія. 2020; 14(3): 52–8.
5. Туманский ВА, Евсеев АВ, Полковников ЮФ. Апоптоз и селективный некроз нейронов ЦНС после клинической смерти и церебральной ишемии: молекулярные механизмы и морфологические особенности. Патология. 2008; 5(2): 19–28.
6. Bai J, Lyden PD. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. Int J Stroke. 2015; 10(2): 143–52.
7. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010; 119(1): 37–53.
8. Coimbra-Costa D, Alva N, Duran M, et al. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. Redox Biol. 2017; 12: 216–25.
9. Elshama SS, Osman H-EH, El-Kenawy AEI-M. Postmortem diagnosis of induced fatal hypothermia in adult albino rats. Rom J Leg Med. 2016; 24(2): 106–14.
10. Garman RH. Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol. 2011; 39(5): 22–35.
11. Ito U, Hakamata Y, Kawakami E, Oyanagi K. Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical

References

1. Bai J, Lyden PD. Revisiting cerebral postischemic reperfusion injury: new insights in understanding reperfusion failure, hemorrhage, and edema. Int J Stroke. 2015; 10(2): 143–52.
2. Bradl M, Lassmann H. Oligodendrocytes: biology and pathology. Acta Neuropathol. 2010; 119(1): 37–53.
3. Coimbra-Costa D, Alva N, Duran M, et al. Oxidative stress and apoptosis after acute respiratory hypoxia and reoxygenation in rat brain. Redox Biol. 2017; 12: 216–25.
4. Elshama SS, Osman H-EH, El-Kenawy AEI-M. Postmortem diagnosis of induced fatal hypothermia in adult albino rats. Rom J Leg Med. 2016; 24(2): 106–14.
5. Garman RH. Histology of the central nervous system. Toxicol Pathol. 2011; 39(5): 22–35.
6. Ito U, Hakamata Y, Kawakami E, Oyanagi K. Degeneration of astrocytic processes and their mitochondria in cerebral cortical regions peripheral to the cortical infarction: heterogeneity of their disintegration is closely associated with disseminated selective neuronal necrosis and maturation of injury. Stroke. 2009; 40(6): 2173–81.
7. Kitchen P, Salman MM, Halsey AM, et al. Targeting Aquaporin-4 Subcellular Localization to Treat Central Nervous System Edema. Cell. 2020; 181(4): 784–799.e19.
8. Kryzhanovsky GN. [General pathophysiology of the nervous system: A guide.] Moscow: Meditsina; 1997: 351 p. Russian.
9. Kvitnitsky-Ryzhov YuN. [Edema and swelling of the brain]. Kyiv: Zdorovia; 1978: 184 p. Russian.
10. Launay J-C, Savourey G. Cold adaptations. Ind Health. 2009; 47(3): 221–27.



- regions peripheral to the cortical infarction: heterogeneity of their disintegration is closely associated with disseminated selective neuronal necrosis and maturation of injury. *Stroke*. 2009; 40(6): 2173–81.
12. Kitchen P, Salman MM, Halsey AM, et al. Targeting aquaporin-4 subcellular localization to treat central nervous system edema. *Cell*. 2020; 181(4):784–99.
 13. Launay J-C, Savourey G. Cold adaptations. *Ind Health*. 2009; 47(3): 221–27.
 14. Liu J, Wang A, Li L, et al. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure*. 2010;19(3): 165–72.
 15. Mäkinen TM, Mäntysaari M, Pääkkönen T, et al. Autonomic nervous function during whole-body cold exposure before and after cold acclimation. *Aviat Space Environ Med*. 2008; 79(9): 875–82.
 16. Mandelbrot BB. *Fractals – form, chance, and dimension*. San-Francisco: W.H. Freeman; 1977. 365 p.
 17. Marzi C, Giannelli M, Tessa C, et al. Toward a more reliable characterization of fractal properties of the cerebral cortex of healthy subjects during the lifespan. *Sci Rep*. 2020 Oct 12 [cited 2022 Nov 20]; 10(1): 16957. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-73961-w>
 18. Meregalli V, Alberti F, Madan CR, et al. Cortical complexity estimation using fractal dimension: A systematic review of the literature on clinical and nonclinical samples. *Eur J Neurosci*. 2022; 55(6): 1547–83.
 19. Nicholls JG, Martin AR, Fuchs PA, et al. *From neuron to brain*. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2012. 768 p.
 20. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014; 94(4): 1077–98.
 21. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9: 676–82.
 22. Tansey EA, Johnson CD. Recent advances in thermoregulation (Review). *Adv Physiol Education*. 2015; 39(3): 139–48.
 23. Wang H, Wang B, Normoyle KP, et al. Brain temperature and its fundamental properties: a review for clinical neuroscientists. *Front Neurosci* [Internet]. 2014 Oct 08 [cited 2022 Nov 20]; 8: 307. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2014.00307/full>
 24. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*. 2010 Mar 30 [cited 2022 Nov 20]; 2: 12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2010.00012/full>
 11. Liu J, Wang A, Li L, et al. Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. *Seizure*. 2010; 19(3): 165–72.
 12. Lutsenko DG, Marchenko VS, Babiychuk VG. NO-Dependent mechanisms of rhythmic cold exposures on functional architectonics of microhemocirculatory bed in rat brain. *Problems of Cryobiology*. 2011; 21(2): 117–24.
 13. Mäkinen TM, Mäntysaari M, Pääkkönen T, et al. Autonomic nervous function during whole-body cold exposure before and after cold acclimation. *Aviat Space Environ Med*. 2008; 79(9): 875–82.
 14. Mandelbrot BB. *Fractals – form, chance and dimension*. San-Francisco: W.H. Freeman; 1977. 365 p.
 15. Maryenko NI, Stepanenko OYu. [Fractal analysis of human cerebellum based on magnetic resonance imaging data: pixel dilating method]. *Morphologia*. 2020; 14(3): 52–8. Ukrainian.
 16. Marzi C, Giannelli M, Tessa C, et al. Toward a more reliable characterization of fractal properties of the cerebral cortex of healthy subjects during the lifespan. *Sci Rep*. 2020 Oct 12 [cited 2022 Nov 20];10(1): 16957. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-73961-w>.
 17. Meregalli V, Alberti F, Madan CR, et al. Cortical complexity estimation using fractal dimension: A systematic review of the literature on clinical and nonclinical samples. *Eur J Neurosci*. 2022; 55(6): 1547–83.
 18. Nicholls JG, Martin AR, Fuchs PA, et al. *From neuron to brain*. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2012. 768 p.
 19. Pekny M, Pekna M. Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 2014; 94(4): 1077–98.
 20. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012; 9: 676–82.
 21. Tansey EA, Johnson CD. Recent advances in thermoregulation (Review). *Adv Physiol Education*. 2015; 39(3): 139–48.
 22. Tumansky VA, Evseev AV, Polkovnikov YuF. Apoptosis and selective necrosis of CNS neurons after clinical death and cerebral ischemia: molecular mechanisms and morphological features. *Pathologia*. 2008; 5(2): 19–28. Russian
 23. Wang H, Wang B, Normoyle KP, et al. Brain temperature and its fundamental properties: a review for clinical neuroscientists. *Front Neurosci* [Internet]. 2014 Oct 08 [cited 2022 Nov 20]; 8: 307. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2014.00307/full>
 24. Wang X, Michaelis EK. Selective neuronal vulnerability to oxidative stress in the brain. *Front Aging Neurosci*. 2010 Mar 30 [cited 2022 Nov 20]; 2: 12. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2010.00012/full>

